

PCT/JP00/05542

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

18.08.00

4  
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 8月18日

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第231144号

REC'D 05 OCT 2000

WIPO

PCT

出願人  
Applicant(s):

協和醗酵工業株式会社

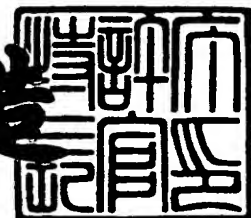
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3075942

【書類名】	特許願
【整理番号】	H11-0529D1
【提出日】	平成11年 8月18日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	A61K 7/06
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市御幸が丘2番地 協和醗酵工業株式会社 筑波研究所内
【氏名】	高橋 知也
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市御幸が丘2番地 協和醗酵工業株式会社 筑波研究所内
【氏名】	神村 彩子
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市御幸が丘2番地 協和醗酵工業株式会社 筑波研究所内
【氏名】	▲浜▼蘭 貴子
【特許出願人】	
【識別番号】	000001029
【氏名又は名称】	協和醗酵工業株式会社
【代表者】	平田 正
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	008187
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	明細書 1
【物件名】	要約書 1
【プルーフの要否】	要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 育毛剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 リゾホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする育毛剤。

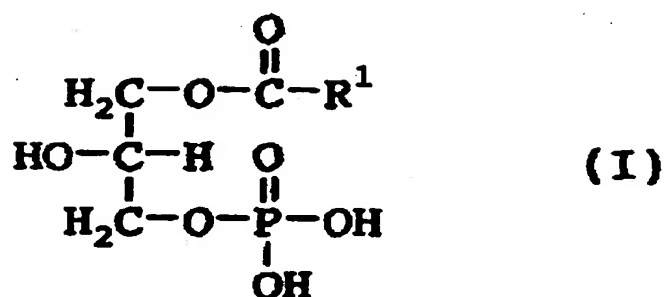
【請求項 2】 実質的にミノキシジルを含有しない請求項 1 記載の育毛剤。

【請求項 3】 リゾホスファチジン酸含量が 0.01～5.0% である請求項 1 または 2 記載の記載の育毛剤。

【請求項 4】 リゾホスファチジン酸含量が 0.01～1.0% である請求項 1 または 2 記載の育毛剤。

【請求項 5】 リゾホスファチジン酸が式 (I)

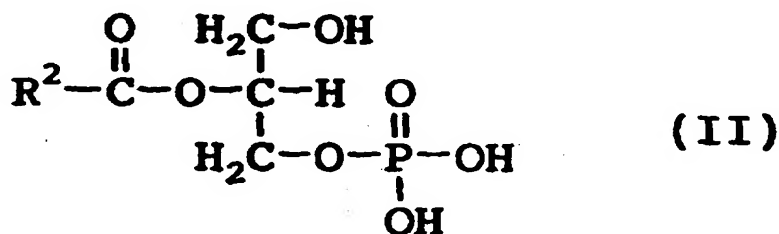
【化 1】



(式中、 $\text{R}^1$  はアルキル、アルケニルまたはアルキニルを表す) で表される化合物である請求項 1～4 のいずれかに記載の育毛剤。

【請求項 6】 リゾホスファチジン酸が式 (II)

【化 2】



(式中、 $\text{R}^2$  はアルキル、アルケニルまたはアルキニルを表す) で表される化合物である請求項 1～4 のいずれかに記載の育毛剤。

【請求項 7】 プロアントシアニジンを含む請求項 1～6 のいずれかに記載の育毛剤。

【請求項 8】 プロアントシアニジンがプロシアニジンB-1、プロシアニジンB-2、プロシアニジンB-3およびプロシアニジンC-1から選ばれる一種または二種以上のプロアントシアニジンである請求項 7 記載の育毛剤。

【請求項 9】 プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理学的に許容される塩を含む請求項 1～6 のいずれかに記載の育毛剤。

【請求項 10】 プロテインキナーゼC特異的阻害剤がカルフォスチンC、ヘキサデシルホスホコリン、パルミトイル-DL-カルニチンおよびポリミキシンBから選ばれる一種または二種以上のプロテインキナーゼC阻害剤である請求項 9 記載の育毛剤。

【請求項 11】 トコフェロールを含む請求項 1～6 のいずれかに記載の育毛剤。

【請求項 12】 トコフェロールがdl- $\alpha$ -トコフェロール、d- $\alpha$ -トコフェロール、酢酸dl- $\alpha$ -トコフェロール、酢酸d- $\alpha$ -トコフェロールおよびニコチン酸dl- $\alpha$ -トコフェロールから選ばれる一種または二種以上のトコフェロールである請求項 11 記載の育毛剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はリゾホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする頭髮の育毛・発毛効果に優れた育毛剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

男性型脱毛症の治療薬としては、多くの物質が研究されてきたが、安全かつ有効な物質は発見されていない。高血圧治療薬として用いられていたミノキシジルは、その副作用として多毛症が発症することが見出され [ブリティッシュ ジャーナル オブ デルマトロジー (British Journal of Dermatology), 101, 593-595 (1979)]、現在では、男性型脱毛症の治療薬として用いられるようになった

が、有効率や安全性・副作用の面で理想的な薬剤とは言えない。

【0003】

一方、多くの植物抽出物が伝統的に男性型脱毛症の治療に用いられてきた。例えば、センブリ (Swertia Japonica Makino) 抽出物は、毛細血管の血流亢進作用があるとされ育毛剤に用いられているが [トクシマ ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディシン (Tokushima Journal of Experimental Medicine) , 9 , 37-59 (1962)] 、その効果は十分とは言えない。

【0004】

リゾホスファチジン酸を含有する育毛剤としては、ミノキシジルリポソーム製剤のリポソーム構成基剤としての配合例が知られている (US 5 0 3 0 4 4 2) 。プロアントシアニジン含有する育毛剤は、WO 9 6 / 0 0 5 6 1 に記載されている。プロテインキナーゼC (PKC) 特異的阻害剤を含有する育毛剤は、特開平 9 - 3 1 5 9 4 7 に記載されている。しかしながら、リゾホスファチジン酸を有効成分として含有する育毛剤については知られていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、リゾホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする、頭髮の育毛・発毛効果に優れた育毛剤を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、外用により育毛作用を有する物質を捜し、検討を重ねた結果、リゾホスファチジン酸に強い育毛活性を見出した。

本発明は、リゾホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする育毛剤に関する。

また、本発明は、リゾホスファチジン酸を有効成分として含有し、実質的にミノキシジルを含有しない育毛剤に関する。

本発明の別の観点からは、リゾホスファチジン酸を有効成分として含有し、かつプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理的に許容される塩、あるいはトコフェロールを含有する育毛剤に関する。

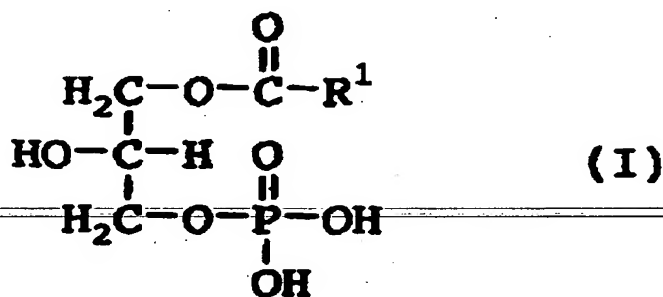
【0007】

【発明の実施の形態】

本発明に用いられるリゾホスファチジン酸は、グリセロール骨格の1位および2位に脂肪酸を有し、3位にリン酸基をもつホスファチジン酸から2位の脂肪酸が解離した式 (I)

【0008】

【化3】

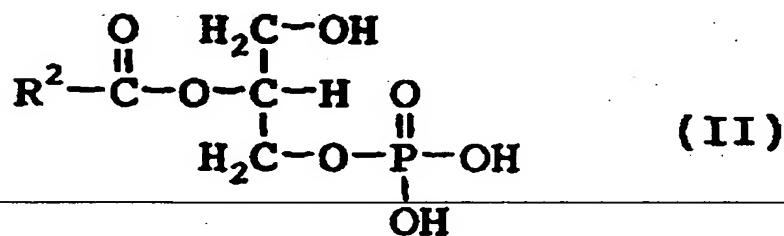


【0009】

(式中、 $\text{R}^1$ はアルキル、アルケニルまたはアルキニルを表す) で表される化合物および1位の脂肪酸が解離した式 (II)

【0010】

【化4】



【0011】

(式中、 $\text{R}^2$ はアルキル、アルケニルまたはアルキニルを表す) で表される化合物を包含する。

式 (I) ~ 式 (II) の基の定義において、アルキルとしては、直鎖または分岐状の炭素数1~23、好ましくは7~17の、例えば、メチル、エチル、プロピル、イ

ソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル等があげられる。アルケニルとしては、直鎖または分岐状の炭素数2~23、好ましくは7~17の、例えばビニル、アリル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ペンタジエニル、ヘキサジエニル等があげられる。アルキニルとしては、直鎖または分岐状の炭素数2~23、好ましくは7~17の、例えばエチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル等があげられる。アルケニルおよびアルキニルにおける不飽和結合の個数は特に限定されることはない。

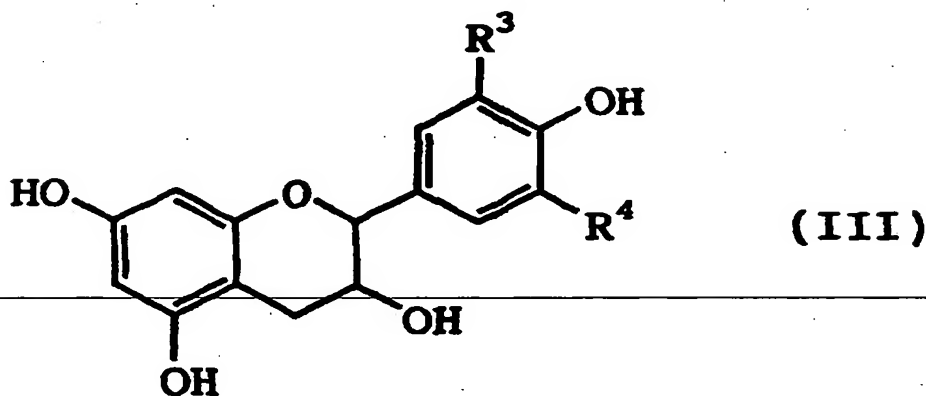
## 【0012】

これらのリゾホスファチジン酸は、卵黄や大豆等から精製したホスファチジン酸を酵素処理（ホスホリパーゼ $A_1$ またはホスホリパーゼ $A_2$ で加水分解）することによって得ることができる。また、化学合成（例えば、US 3 423 440）によって得ることもできる。

本発明に用いられるプロアントシアニジンは、式 (III)

## 【0013】

【化5】



## 【0014】

（式中、 $R^3$ および $R^4$ は同一または異なって水素原子または水酸基を表す）等で表されるフラバン-3-オール誘導体を構成単位として重合した化合物群をいう。

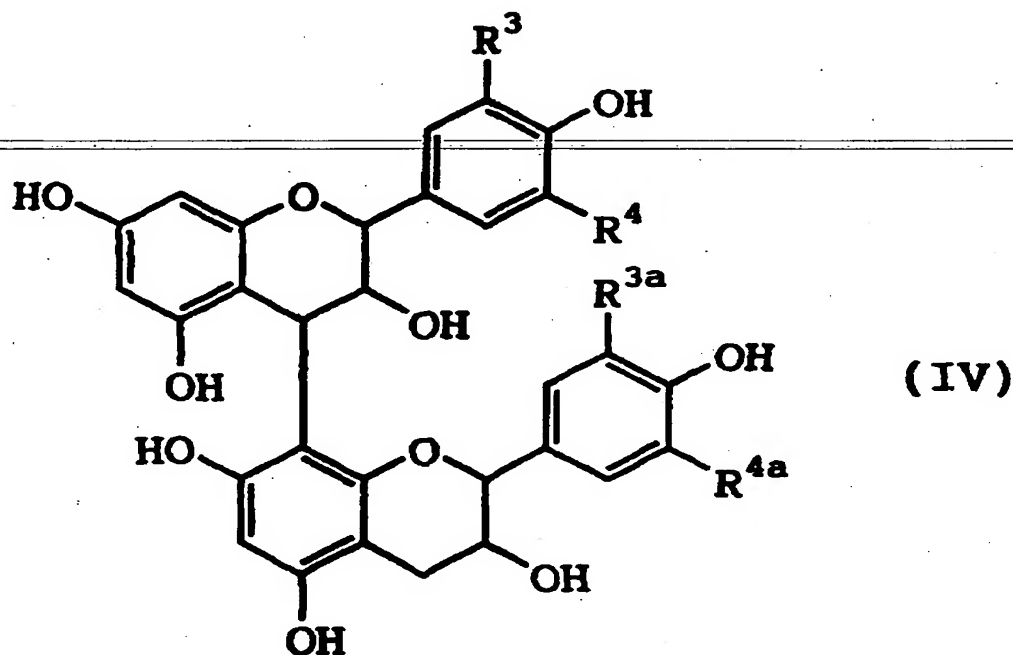
フラバン-3-オール誘導体の具体例としては、カテキン、エピカテキン、ガロ

カテキン、エピガロカテキン、アフゼレチン、エピアフゼレチン等があげられ、これらの光学異性体もすべて含まれるが、エピカテキンまたはカテキンを構成単位とするプロアントシアニジンが、本発明ではより好ましく用いられる。

式 (III) で表されるフラバン-3-オール誘導体の結合様式としては、いかなるものも含まれるが、例えばフラバン-3-オール誘導体が2個重合した2量体としては、式 (IV)

【0015】

【化6】



【0016】

(式中、 $R^3$ および $R^4$ はそれぞれ前記と同義であり、 $R^{3a}$ および $R^{4a}$ はそれぞれ前記 $R^3$ および $R^4$ と同義である) で表される結合様式をとるものがあげられ、3量体以上の重合体としては、同一または異なるこれらの結合様式の組み合わせによるものがあげられる。

本発明に用いられるプロアントシアニジンは、フラバン-3-オール誘導体の2量体以上であればよいが、好ましくは2~10量体、より好ましくは2~5量体、さらに好ましくは2~3量体である。フラバン-3-オール誘導体の2量体としては、例えばエピカテキン-(4 $\beta$ →8)-カテキン等のエピカテキンとカテキンの結合体、エピ



カテキン-(4 $\beta$ →8)-エピカテキン等のエピカテキンの2量体、カテキン-(4 $\alpha$ →8)-カテキン等のカテキンの2量体等があげられ、フラバン-3-オール誘導体の3量体としては、例えばエピカテキン-(4 $\beta$ →8)-エピカテキン-(4 $\beta$ →8)-エピカテキン等のエピカテキンの3量体、カテキン-(4 $\alpha$ →8)-カテキン-(4 $\alpha$ →8)-カテキン等のカテキンの3量体、エピカテキン-(4 $\beta$ →8)-エピカテキン-(4 $\beta$ →8)-カテキン等のエピカテキンとカテキンの混合3量体等があげられる。

【0017】

また、これらプロアントシアニジンに没食子酸やグルコース、ラムノース等の糖類が付加した化合物も本発明のプロアントシアニジンに含まれる。

プロアントシアニジンは、ブドウ属、リンゴ属、オオムギ属、カキ属、ココヤシ属、カカオ属、マツ属、インゲン属、ナンキンマメ属等に属するブドウ、リンゴ、オオムギ、カキ、ヤシ、カカオ、マツ、アズキ、ピーナッツ等の各種の植物から抽出精製して得られる他、化学合成によっても得ることができる。

【0018】

例えば、プロアントシアニジンの植物からの抽出精製は、次のような公知の方法で行うことができる。

原料である植物の果実、種子、葉、茎、根、根茎等を適当な時期に採取した後、そのままあるいは通常空気乾燥等の乾燥工程に付し、抽出原料とする。乾燥した植物体からプロアントシアニジンの抽出を行う場合は、公知の方法 [ケミカル アンド ファーマシューティカル ブリテン (Chemical & Pharmaceutical Bulletin), 3, 3218 (1990) および同, 40, 889-898 (1992)] に準じて行うことができる。

【0019】

すなわち、原料を粉碎もしくは細切した後、溶媒を用いて抽出を行う。抽出溶媒としては、水、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類等の親水性もしくは親油性の溶媒を、単独もしくは混合溶媒として用いることができる。抽出温度は、通常0～100℃、好ましくは5～50℃である。抽出時間は、1時間～10日間程度であり、溶媒量は、乾燥原料に対して通常1～

30倍重量、好ましくは5～10倍重量である。抽出操作は、攪拌または浸漬放置し、必要に応じて2～3回繰り返す。

#### 【0020】

上記の操作で得られた粗抽出液から不溶性残渣を濾過もしくは遠心分離により取り除いた抽出液、あるいは植物の搾汁液や樹液からのプロアントシアニジンの精製方法は、公知の分離精製方法であればどのようなものでもよいが、二相溶媒分配法、カラムクロマトグラフィー法、分取高速液体クロマトグラフィー法等を単独もしくは組み合わせて用いることが好ましい。例えば二相溶媒分配法としては、前記の抽出液から油溶性成分や色素をn-ヘキサン、石油エーテル等により抽出除去する方法、該抽出液からn-ブタノール、メチルエチルケトン等の溶媒と水との分配により、溶媒相へプロアントシアニジンを回収する方法等があげられる。カラムクロマトグラフィー法としては、順相系シリカゲル、逆相系シリカゲルを用いる方法、担体としてダイヤイオンHP-20、セパビーズSP-207等を用いる吸着カラムクロマトグラフィー法、担体としてセファデックスLH-20等を用いるゲル濾過法等があげられ、これらを単独もしくは組み合わせて用い、反復して使用することもできる。分取高速液体クロマトグラフィー法としては、オクタデシルシリカ等を用いる逆相系のカラムを用いる方法、シリカゲル等を用いる順相系のカラムを用いる方法等があげられる。

#### 【0021】

上記精製方法により、前記の抽出液から塩類等水溶性のイオン性物質、糖類、多糖類等の非イオン性物質、油分、色素等を除去し、プロアントシアニジンを得ることができる。

また、ブドウ由来プロアントシアニジンは、アクタ デルマト ペネレオロジカ (Acta Dermato Venereologica), 78, 428-432 (1998)に記載の方法またはその方法に準じて、プロシアニジンB-1 [エピカテキン-(4 $\beta$ →8)-カテキン]、プロシアニジンB-2 [エピカテキン-(4 $\beta$ →8)-エピカテキン]、プロシアニジンB-3 [カテキン-(4 $\beta$ →8)-カテキン] およびプロシアニジンC-1 [エピカテキン-(4 $\beta$ →8)-エピカテキン-(4 $\beta$ →8)-エピカテキン] は、ジャーナル オブ インヴェスティゲイティブ デルマトロジー (The Journal of Investigative Dermatology), 1

12, 310-316 (1999)に記載の方法またはその方法に準じてそれぞれ抽出精製することができる。

【0022】

プロアントシアニジンの化学合成による製造は、エピカテキンまたはカテキンの2量体の製造方法が記載されているジャーナル オブ ケミカル ソサエティー パーキン トランサクション I (Journal of Chemical Society, Perkin Transaction I), 1535-1543 (1983)またはフィトケミストリー (Phytochemistry), 25, 1209-1215 (1986)に記載の方法あるいはそれらに準じた方法により行うことができる。

プロアントシアニジンを本発明の有効成分として用いる場合、プロアントシアニジンは、一種または二種以上混合してもよく、具体的な例としては、ブドウ種子抽出物プロアントシアニジン、リンゴ由来プロアントシアニジン、マツ由来プロアントシアニジン、精製プロシアニジンオリゴマー、プロシアニジンB-1、プロシアニジンB-2、プロシアニジンB-3、プロシアニジンC-1等から選ばれる一種または二種以上、中でもプロシアニジンB-1、プロシアニジンB-2、プロシアニジンB-3およびプロシアニジンC-1から選ばれる一種または二種以上が好ましく用いられる。

【0023】

本発明に用いられるプロテインキナーゼC特異的阻害剤としては、プロテインキナーゼCを特異的に阻害するものであればいかなるものでも用いられるが、好ましくは、プロテインキナーゼC (PKC) 阻害活性とプロテインキナーゼA (PKA) 阻害活性を以下に示すPKC阻害活性測定法およびPKA阻害活性測定法で測定したとき、PKAの50%阻害定数（以下、 $PKA-IC_{50}$ と略す）とPKCの50%阻害定数（以下、 $PKC-IC_{50}$ と略す）の比（以下、 $PKA-IC_{50}/PKC-IC_{50}$ と略す）が3以上、好ましくは $3 \sim 10^9$ 、より好ましくは $10 \sim 10^9$ であるプロテインキナーゼ阻害剤が用いられる。具体的には、カルフォスチンC、ヘキサデシルホスホコリン、パルミトイル-DL-カルニチン、ポリミキシンBまたはそれらの生理学的に許容される塩等から選ばれる一種または二種以上をあげることができる。

【0024】

これらの生理学的に許容される塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、蟻酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等があげられる。

PKC阻害活性測定法およびPKA阻害活性測定法について以下に示す。

#### (1) PKC阻害活性測定法

PKCの阻害活性の測定は、吉川らの方法 [ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry) , 257, 13341 (1982)] に準じて行うことができる。

##### 【0025】

2.5  $\mu\text{mol}$  酢酸マグネシウム、50  $\mu\text{g}$  ヒストンタイプIIIS (シグマ社製)、20  $\mu\text{g}$  ホスファチジルセリン、0.8  $\mu\text{g}$  ダイオレイン、25nmol 塩化カルシウム、5  $\mu\text{g}$  粗酵素 (吉川らの方法によりラットの脳より部分精製したもの) および5  $\mu\text{mol}$  トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) を含む250  $\mu\text{l}$  水溶液に検体を含む前記水溶液 (10  $\mu\text{l}$ ) を加え、30℃で3分間インキュベートする。インキュベート後、1.25nmol [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (5~10 $\times 10^3$  cpm/nmol) を加え、30℃で3分間リン酸化反応を行い、25%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させる。該反応液を酢酸セルロース膜 (ポアサイズ0.45  $\mu\text{m}$ ) (東洋濾紙社製) で濾過し、5%トリクロロ酢酸で4回洗浄後、該膜上に残った放射活性を測定し検体値とする。また、上記操作を検体を加えないで行い、放射活性を測定し対照値とする。

##### 【0026】

対照値に対して、50%の検体値を示すときの検体のモル濃度を、PKCの50%阻害定数 (PKC-IC<sub>50</sub>) とする。

#### (2) PKA阻害活性測定法

PKAの阻害活性の測定は、クオ (Kuo) らの方法 [バイオケミストリー (Biochemistry) , 64, 1349 (1969)] に準じて行うことができる。

##### 【0027】

5  $\mu\text{mol}$  トリス塩酸緩衝液 (pH6.8)、2.5  $\mu\text{mol}$  酢酸マグネシウム、100  $\mu\text{g}$  ヒストンタイプIIIS (シグマ社製)、0.25nmol c-AMPおよび200  $\mu\text{g}$  粗酵素 [クオ (Kuo

）らの方法により子牛の心臓より部分精製したもの] を含む250 $\mu$ lの水溶液に検体を含む前記水溶液（10 $\mu$ l）を加え、30℃で3分間インキュベートする。インキュベート後、1.25nmol [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (5~10 $\times$ 10<sup>3</sup>cpm/nmol) を加え、30℃で3分間リン酸化反応を行い、25%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させる。該反応液を酢酸セルロース膜（ポアサイズ0.45 $\mu$ m）（東洋濾紙社製）で濾過し、5%トリクロロ酢酸で4回洗浄後、該膜上に残った放射活性を測定し検体値とする。また、上記操作を検体を加えないで行い、放射活性を測定し対照値とする。

#### 【0028】

対照値に対して、50%の検体値を示すときの検体のモル濃度をPKAの50%阻害定数（PKA-IC<sub>50</sub>）とする。

本発明に用いられるトコフェロールとしては、例えば市販されている天然由来品、合成品のいずれも用いることができ、また、酢酸エステルやニコチン酸エステル等の誘導体を用いることもできる。具体的には、dl- $\alpha$ -トコフェロール、d- $\alpha$ -トコフェロール、酢酸dl- $\alpha$ -トコフェロール、酢酸d- $\alpha$ -トコフェロール、ニコチン酸dl- $\alpha$ -トコフェロール等があげられる。

#### 【0029】

本発明の育毛剤の剤型としては、リゾホスファチジン酸、あるいは該リゾホスファチジン酸と、プロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはトコフェロールを配合しうる剤型であればどのような剤型を用いることもできる。例えば、適当な医薬基剤と配合して液状あるいは固形状の育毛剤として用いることができる。

#### 【0030】

液状または固形状の育毛剤型としては、ヘヤーリキッド、ヘヤートニック、ヘヤーローション等の液状剤型、軟膏、ヘヤークリーム等の固形状剤型があげられ、各々好適な基剤に本発明に用いられるリゾホスファチジン酸、あるいは該リゾホスファチジン酸と、プロアントシアニジン、プロテインキナーゼC阻害剤またはトコフェロールを添加し、常法により製造することができる。

#### 【0031】

本発明の育毛剤中のリゾホスファチジン酸の含有量は、リゾホスファチジン酸

の種類や物性に由来する経皮吸収性によって大きく異なるが、単独または混合物として通常0.01~5.0重量%（以下、単に%という）、好ましくは0.01~1.0%、より好ましくは、0.1~0.5%である。プロアントシアニジンの含有量は、精製度によって異なるが、通常0.01~10%、好ましくは0.1~5%、より好ましくは0.3~2%である。また、プロテインキナーゼC阻害剤の含有量は、阻害活性の強さや物性に由来する経皮吸収性によって大きく異なるが、単独または混合物として通常0.0001~10%、好ましくは0.001~1%、より好ましくは0.01~0.1%である。トコフェロールの含有量は通常0.01~2%、好ましくは0.05~1%、より好ましくは0.1~0.5%である。

### 【0032】

液状剤型に好適な基剤としては、育毛剤に通常使用されているもの、例えば精製水、エチルアルコール、多価アルコール類があげられ、必要により添加剤を添加してもよい。

多価アルコールとしては、グリセロール、1,3-ブチレングリコール、プロピレングリコール等があげられる。

### 【0033】

添加剤としては、香料、色素、界面活性剤、殺菌剤等があげられる。また、酸化防止剤、ホルモン剤、紫外線吸収剤、消炎剤、清涼剤、保湿剤、ビタミン類、生薬エキス、チンキ類、金属イオン封鎖剤、角質溶解剤等も適宜添加してよい。

香料としては、オレンジ油、レモン油、ベルガモット油、ライム油、レモングラス油、ラベンダー油等の天然香料およびメントール、ローズオキサイド、リナロール、シトラール、酢酸リナリル等の合成香料があげられる。

### 【0034】

色素としては、ベンガラ、黄土、酸化クロム、水酸化クロム、マンガンバイレット、赤色2号、黄色4号、緑色3号、青色1号等があげられる。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン（60）硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレン（8）オレイルエーテル、ポリオキシエチレン（10）オレイルエーテル、モノオレイン酸ポリオキシエチレン（10）、ポリオキシエチレン（30）グリセリルモノステアレート、モノステアリン酸ソルビタン、モノステアリン酸ポリオキ

シエチレン (30) グリセリル、モノオレイン酸ポリオキシエチレン (20) ソルピタン、ショ糖脂肪酸エステル、モノオレイン酸ヘキサグリセリン、モノラウリン酸ヘキサグリセリン、ポリオキシエチレン還元ラノリン、ポリオキシエチレン (20) ラノリンアルコール、ポリオキシエチレン (25) グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル、N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル等があげられる。

【0035】

殺菌剤としては、トリクロロヒドロキシジフェニルエーテル、ヒノキチオール、トリクロサン、クロルヘキシジングルコン酸塩、フェノキシエタノール、レゾルシン、イソプロピルメチルフェノール、アズレン、サリチル酸、ジンクピリチオン、塩化ベンザルコニウム、感光素301号、モノニトログアヤコールナトリウム等があげられる。

【0036】

酸化防止剤としては、ブチルヒドロキシアニソール、イソプロピルガレート、没食子酸プロピル、エリソルビン酸等があげられる。

ホルモン類としては、エチニルエストラジオール、エストロン、エストラジオール等があげられる。

紫外線吸収剤としては、ジヒドロキシベンゾフェノン等のベンゾフェノン類、メラニン、パラアミノ安息香酸エチル、パラジメチルアミノ安息香酸2-エチルヘキシルエステル、シノキサート、パラメトキシ桂皮酸2-エチルヘキシルエステル、2-(2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル)ベンゾトリアゾール、ウロカニン酸、金属酸化物微粒子等があげられる。

【0037】

消炎剤としては、グリチルリチン酸ジカリウム、 $\beta$ -グリチルレチン酸、アラントイン、塩酸ジフェンヒドラミン、グアイアズレン、1-メントール等があげられる。

清涼剤としては、トウガラシチンキ、1-メントール、カンフル等があげられる。

【0038】

保湿剤としては、L-ピロリドンアルボン酸、ヒアルロン酸ナトリウム、コンドロイチン硫酸、冬虫夏草抽出物、サフラン抽出物等があげられる。

ビタミン類としては、ニコチン酸ベンジル、ニコチン酸アミド、D-パントテニルアルコール、パントテニルエチルエーテル、ピオチン、塩酸ピリドキシン、リボフラビン等があげられる。

【0039】

生薬エキスとしては、センブリエキス、ニンニクエキス、ニンジンエキス、アロエエキス、キナエキス等があげられる。

チンキ類として、トウガラシチンキ、ショウキョウチンキ、カンタリスチンキ等があげられる。

金属イオン封鎖剤としては、エチレンジアミンテトラアセテートまたはその塩等があげられる。

【0040】

角質溶解剤としては、レゾルシン、サリチル酸、乳酸等があげられる。

上記の液状剤型を噴霧剤として用いるときは、可燃ガス、不燃ガス等を用いることができる。可燃ガスとしては、LPG（液化石油ガス）、ジメチルエーテル等があげられ、不燃ガスとしては、窒素ガス、炭酸ガス等があげられる。

固体状剤型の基剤としては、ワセリン、固形パラフィン、植物油、鯊物油、ラノリン、ろう類、マクロゴール等があげられ、必要により前記の添加剤、レシチン等の乳化剤、エチルアルコール、イソプロピルアルコール等の低級アルコール等を添加してもよい。

【0041】

本発明の育毛剤の投与量は年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、成人一人当たり、一回に0.05～250mg、好ましくは0.1mg～150mgを一日一回から数回、経皮投与される。

次に、実施例により本発明を詳細に説明する。

【0042】

【実施例】

実施例 1：組成物 1 および組成物 2 の作製



モノパルミトイルリゾホスファチジン酸（フナコシ社製） 0.3%

エチルアルコール 70%

1,3-ブチレングリコール 3%

---

N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル 0.25%

---

ポリオキシエチレン（25）グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル 0.25%

上記混合物に精製水を加えて100%とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物 1 を調製した。

【 0 0 4 3 】

上記組成物において、モノパルミトイルリゾホスファチジン酸の代わりに精製水を加えて、組成物 2 として調製した。

---

実施例 2：組成物 3 および組成物 4 の作製

モノパルミトイルリゾホスファチジン酸（フナコシ社製） 0.3%

ブドウ由来プロアントシアニジン 3%

エチルアルコール 70%

1,3-ブチレングリコール 3%

N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル 0.25%

ポリオキシエチレン（25）グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル 0.25%

ブドウ由来プロアントシアニジンは、アクタ デルマト ベネレオロジカ (Acta Dermato Venereologica), 78, 428-432 (1998)に記載の方法またはその方法に準じて製造した。

---

【 0 0 4 4 】

上記混合物に精製水を加えて100%とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物 3 を調製した。

上記組成物において、モノパルミトイルリゾホスファチジン酸の代わりに精製水を加えて組成物 4 として調製した。

実施例 3：組成物 5 および組成物 6 の作製

モノパルミトイルリゾホスファチジン酸（フナコシ社製） 0.3%

プロシアニジン B-2	1%
エチルアルコール	70%
1,3-ブチレングリコール	3%

---

N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル	0.25%
------------------------	-------

---

ポリオキシエチレン (25) グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル	0.25%
---	-------

プロシアニジン B-2 は、ジャーナル オブ インヴェスティゲイティブ デルマトロジー (The Journal of Investigative Dermatology), 112, 310-316 (1999) に記載の方法またはその方法に準じて製造した。

【 0 0 4 5 】

上記混合物に精製水を加えて 100% とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物 5 を調製した。

上記組成物において、モノパルミトイルリゾホスファチジン酸の代わりに精製水を加えて、組成物 6 として調製した。

実施例 4 : 組成物 7 および組成物 8 の作製

モノパルミトイルリゾホスファチジン酸 (フナコシ社製)	0.3%
-----------------------------	------

プロシアニジン C-1	1%
-------------	----

エチルアルコール	70%
----------	-----

1,3-ブチレングリコール	3%
---------------	----

N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル	0.25%
------------------------	-------

ポリオキシエチレン (25) グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル	0.25%
---	-------

プロシアニジン C-1 は、ジャーナル オブ インヴェスティゲイティブ デルマトロジー (The Journal of Investigative Dermatology), 112, 310-316 (1999) に記載の方法またはその方法に準じて製造した。

【 0 0 4 6 】

上記混合物に精製水を加えて 100% とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物 7 を調製した。

上記組成物において、モノパルミトイルリゾホスファチジン酸の代わりに精製

水を加えて組成物 8 として調製した。

実施例 5 : 組成物 9 および組成物 1 0 の作製

モノパルミトイルリゾホスファチジン酸 (フナコシ社製)	0.3%
カルフォスチン C (協和発酵工業社製)	0.03%
エチルアルコール	90%
1,3-ブチレングリコール	3%
N-アセチルグルタミンイソステアрилエステル	0.25%
ポリオキシエチレン (25) グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル	0.25%

上記混合物に精製水を加えて 100% とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物 9 を調製した。

#### 【 0 0 4 7 】

上記組成物において、モノパルミトイルリゾホスファチジン酸の代わりに精製水を加えて組成物 1 0 として調製した。

実施例 6 : 組成物 1 1 および組成物 1 2 の作製

モノパルミトイルリゾホスファチジン酸 (フナコシ社製)	0.3%
ヘキサデシルホスフォコリン (シグマ社製)	0.3%
エチルアルコール	70%
1,3-ブチレングリコール	3%
N-アセチルグルタミンイソステアрилエステル	0.25%
ポリオキシエチレン (25) グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル	0.25%

上記混合物に精製水を加えて 100% とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物 1 1 を調製した。

#### 【 0 0 4 8 】

上記組成物において、モノパルミトイルリゾホスファチジン酸の代わりに精製水を加えて組成物 1 2 として調製した。

実施例 7 : 組成物 1 3 および組成物 1 4 の作製

モノパルミトイルリゾホスファチジン酸 (フナコシ社製)	0.3%
-----------------------------	------

dl- $\alpha$ -トコフェロール (エーザイ社製)	1%
エチルアルコール	70%
1,3-ブチレングリコール	3%
N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル	0.25%

ポリオキシエチレン (25) グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル 0.25%

上記混合物に精製水を加えて100%とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物 1 3 を調製した。

【 0 0 4 9 】

上記組成物において、モノパルミトイルリゾホスファチジン酸の代わりに精製水を加えて、組成物 1 4 として調製した。

参考例 1 : PKC-IC<sub>50</sub> および PKA-IC<sub>50</sub> の測定

カルフォスチンC、ヘキサデシルホスフォコリン、パルミトイル-DL-カルニチンおよびポリミキシンBについて、前述のPKC阻害活性測定法およびPKA阻害活性測定法に従って、PKC阻害活性およびPKA阻害活性を測定し、PKC-IC<sub>50</sub> およびPKA-IC<sub>50</sub> を求めた。

結果を第 1 表に示す。

【 0 0 5 0 】

【表 1】

検体	第 1 表		
	PKC-IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	PKA-IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	PKA-IC <sub>50</sub> / PKC-IC <sub>50</sub>
カルフォスチンC	0.05	>50	>1000
ヘキサデリスホスフォコリン	94	>1000	>10.6
パルミトイル-DL-カルニチン	230	>1000	>4.3
ポリミキシンB	2.6	>1000	>384

【 0 0 5 1 】

次に、本発明の育毛剤の作用について、試験例により具体的に示す。

試験例 1 : マウス毛包上皮細胞培養に対する促進効果

毛包上皮細胞の分離および培養はTanigakiらの方法【アーカイヴズ オブ デルマトロジカル リサーチ (Archives of Dermatological Research) , 284, 290-296 (1992)] を改変して行った。

---

【0052】

すなわち、4日令のC3Hマウス（日本チャールスリバー）の背部皮膚を採取し、500単位/mlのディスパーゼ（合同酒清）および5%ウシ胎児血清（FCS）を含むMEM培地（Eagle's Minimum Essential Medium）で4℃、16時間処理した。

得られた皮膚切片から表皮を剥離し、真皮層を0.25%コラゲナーゼN-2（新田ゼラチン）および10%FCSを含むDMEM培地（Dulbecco's modified Eagle Medium）で37℃、1時間処理し真皮懸濁液を得た。真皮懸濁液を212ミクロンのナイロンメッシュ（日本理化学機械）で濾過後、濾液を1000rpmで5分間遠心分離し、毛包組織を含むペレットを得た。ペレットに、カルシウム・マグネシウムフリーPBS（Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline）溶液を加え、ピペットを用いて懸濁後、15分間静置することにより毛組織を沈降させた。得られた毛組織を用いて、上記ペレットで行った、カルシウム・マグネシウムフリーPBS溶液の添加、ピペットによる懸濁、15分間静置・沈降操作と同様の操作を3回繰り返した。

【0053】

得られた毛組織に0.1%エチレンジアミン四酢酸（EDTA）-0.25%トリプシン液（ギブコ社製）を加え、37℃で5分間処理後、10%FCSを含むDMEM培地を加え、 $3 \times 10^5$ /mlの細胞濃度の毛組織細胞液を調製した。毛組織細胞液を24穴コラーゲンコートプレート（イワキガラス社製）へ1ml/ウェルずつ播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で24時間培養を行った。

---

【0054】

培養後、MCDB153培地（極東製薬社製）にウシインシュリン（シグマ社製）5mg/L、マウス上皮増殖因子（EGF）（宝酒造社製）5μg/L、ウシ下垂体抽出物（極東製薬社製）40mg/L、ヒトトランスフェリン（シグマ社製）10mg/L、ハイドロコチゾン（シグマ社製）0.4mg/L、プロゲステロン（コラボラティブ リサーチ社製）0.63μg/L、0-ホスホエタノールアミン（シグマ社製）14mg/L、エタノールアミン（シグマ社製）6.1mg/L、ペニシリン（和光社製）50U/ml、ストレプトマイ

シン（和光社製）50  $\mu$ g/ml並びにリゾホスファチジン酸、およびプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはトコフェロールを含むDMSO溶液（1/100体積加えた）を添加した培地へ培地交換し、さらに、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で5日間培養を行った。なお培地は一日おきに交換した。

## 【0055】

なお、上記培地において、リゾホスファチジン酸、およびプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはトコフェロールを含むDMSO溶液の代わりにDMSOのみを1/100体積量加えた培地で培養したものを対照群とした。

細胞増殖度の測定は、MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] を用いた方法で行った【実験医学別冊 バイオマニュアルUP シリーズ 分子生物学研究のための培養細胞実験法、89-92頁、羊土社（1995年）】。

## 【0056】

24穴マイクロプレート（2cm<sup>2</sup>/ウェル）の各ウェルに培養液1mlに対し1/10体積のMTTのPBS溶液（5mg/ml）を加え、揺らして均一にし、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で4時間培養した。4時間後培養液を吸引し、各々のプレートに1mlの0.04N HClイソプロピルアルコール溶液を加え、ウェル中に生成したフォルマザンが完全に溶けるまで混和した。

650nmを対照とし、570nmにおける吸光度を測定し、細胞の増殖度を測定した。

本発明における化合物の増殖促進活性を第2表に示す。

## 【0057】

## 【表 2】

第 2 表:対照群の増殖を 100 としたときの相対増殖度

	-リゾホスファチジン酸	+リゾホスファチジン酸 (3 $\mu$ M)
プロシアニジン B-2 (30 $\mu$ M)	260	327
カルフォスチン C (3 $\mu$ M)	180	272
dl- $\alpha$ -トコフェロール (30 $\mu$ M)	150	240
リゾホスファチジン酸 (3 $\mu$ M)	100	200

## 【0058】

第 2 表より、本発明における育毛剤は著しいマウス毛包上皮細胞増殖活性を示した。

## 試験例 2: マウスの発毛に対する効果

小川らの方法 [ジャーナル オブ デルマトロジー (The Journal of Dermatology), 10, 45-54 (1983)] を参考に、マウスによる発毛効果の試験を行った。

## 【0059】

毛周期の休止期にある 9 週令の C3H/HeSlc 雄性マウス (一群 4~5 匹) の背部毛を電気バリカンと電気シェーバーで剃毛し、実施例 1~7 で作製した組成物を一日一回、剃毛部に 200  $\mu$  l ずつ均一に塗布した。組成物 2 を対照群とした。

試験塗布開始後 18 日目のマウス背部皮膚を採取し、写真撮影を行った後、画像解析処理装置 (アピオニクス社製、スピカ II) を用いて背部皮膚全面積に対する発毛部の 100 分率を求め、被検薬剤群の発毛率の値から対照群の発毛率の値を差し引いた値を増加発毛面積率 (%) とした。

結果を第 3 表に示した。

## 【0060】

【表 3】

第 3 表

組成物	増加発毛面積率(%)
2 (対照群)	0
1	35
3	60
4	45
5	64
6	51
7	67
8	57
9	68
10	60
11	73
12	63
13	60
14	45

## 【0061】

第 3 表で示したように、本発明のリゾホスファチジン酸を含有する育毛剤では、顕著なマウスの毛包成長促進効果が見られた。また、プロアントシアニジン、プロテインキナーゼ C 特異的阻害剤、トコフェロール各々の毛包成長促進効果は、リゾホスファチジン酸と混合することによって増強された。

## 【0062】

## 【発明の効果】

本発明によれば、リゾホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする、頭髪の育毛・発毛効果に優れ、かつ安全で有効な育毛剤を提供することができる。



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 リゾホスファチジン酸を有効成分として含有する育毛剤を提供するこ

---

と。

【解決手段】 リゾホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする育毛剤を提供する。

【選択図】 なし

---

出 願 人 履 歴 情 報

---

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号  
氏 名 協和醗酵工業株式会社

---